

Chromatographic purification and separation process for mixtures of nucleic acids

Patent Number: ☐ US6383393
Publication date: 2002-05-07
Inventor(s): COLPAN METIN [DE]; SCHORR JOACHIM [DE]; HERRMANN RALF [DE]; FEUSER PETRA [DE]
Applicant(s): QIAGEN GMBH [DE]
Requested Patent: ☐ WO9501359
Application Number: US19960392882 19960315
Priority Number (s): DE19934321904 19930701; WO1994EP02056 19940624
IPC Classification: B01D15/08
EC Classification: C12N15/10A2B
Equivalents: ☐ CA2142910, ☐ DE4321904, DK658164T, ☐ EP0658164 (WO9501359), B1, ES2155477T, JP8501321T

Abstract

A method for the purification and separation of nucleic acid mixtures by chromatography including adsorbing the nucleic acids to be separated and purified from a solution with a high concentration of salts (ionic strength) and/or a high concentration of alcohol on a substrate and subsequent desorbing from the substrate by means of a solution with lower concentration of salts (ionic strength).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-501321

(43) 公表日 平成8年(1996)2月13日

| | | | |
|------------------------------------|--|---------------|-----|
| (51)Int.Cl. ⁹ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I |
| C 0 7 H 21/00 | | 8615-4C | |
| B 0 1 D 15/08 | | 9344-4D | |
| C 0 7 H 21/02 | | 8615-4C | |
| 21/04 | Z | 8615-4C | |
| | | 9281-4B | |
| | | C 1 2 N 15/00 | A |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全 25 頁) 最終頁に続く | | | |
| (21)出願番号 | 特願平7-503247 | | |
| (86) (22)出願日 | 平成6年(1994)6月24日 | | |
| (85)翻訳文提出日 | 平成7年(1995)3月1日 | | |
| (86)国際出願番号 | P C T / E P 9 4 / 0 2 0 5 6 | | |
| (87)国際公開番号 | W O 9 5 / 0 1 3 5 9 | | |
| (87)国際公開日 | 平成7年(1995)1月12日 | | |
| (31)優先権主張番号 | P 4 3 2 1 9 0 4 . 7 | | |
| (32)優先日 | 1993年7月1日 | | |
| (33)優先権主張国 | ドイツ (DE) | | |
| (81)指定国 | EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US | | |
| (71)出願人 | キアゲン・ゲーエムベーハー ドイツ連邦共和国、ヒルデン、デー 40724、マックスホルメルシュトラ セ、4 | | |
| (72)発明者 | コルバン、メチン ドイツ連邦共和国、エッセン、デー 45219、ウーラントシュトラッセ 5 | | |
| (72)発明者 | ショー、ヨアヒム ドイツ連邦共和国、デュッセルドルフ、デ ー40321、アン・デル・シュツェンヴィ ーゼ 43 | | |
| (74)代理人 | 弁理士 柳川 泰男 | | |
| 最終頁に続く | | | |

(54) 【発明の名称】 クロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法

(57) 【要約】

高濃度の塩（イオン強度）および／または高濃度のアルコールを含む溶液から分離精製すべき核酸を基体に吸着させ、次いでより低濃度の塩（イオン強度）を含む溶液によって該基体から脱着させることからなる、クロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法において、該核酸混合物を、一高濃度の塩（イオン強度）を含み、かつ1～50容量%の鎖長C₁～C₃の脂肪族アルコール、および／またはポリエチレングリコール（PEG）、および／または疎水性の無機および／または有機ポリマー、および／またはトリクロロ酢酸（TCA）などの有機酸を含む吸着水溶液から、金属酸化物および／または混合金属酸化物、シリカゲル、基本的にガラス、アルミナ、ゼオライト、二酸化チタン、二酸化ジルコニウムからなる材料の多孔性もしくは非多孔性の無機基体上に吸着させる；一任意に洗浄液で洗浄する；そしてその後、一より低濃度の塩（イオン強度）を含む溶液で溶出し、得られた核酸もしくは核酸分画を収集する；ことを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

1. 高濃度の塩（イオン強度）および／または高濃度のアルコールを含む溶液から分離精製すべき核酸を基体に吸着させ、次いでより低濃度の塩（イオン強度）を含む溶液によって該基体から脱着させることからなる、クロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法において、該核酸混合物を、

－高濃度の塩（イオン強度）を含み、かつ1～50容量%の鎖長 C_1 － C_5 の脂肪族アルコール、および／またはポリエチレングリコール（PEG）、および／または疎水性の無機および／または有機ポリマー、および／またはトリクロロ酢酸（TCA）などの有機酸を含む吸着水溶液から、金属酸化物および／または混合金属酸化物、シリカゲル、基本的にガラス、アルミナ、ゼオライト、二酸化チタン、二酸化ジルコニウムからなる材料の多孔性もしくは非多孔性の無機基体上に吸着させる；

－任意に洗浄液で洗浄する；そしてその後、

－より低濃度の塩（イオン強度）を含む溶液で溶出し、得られた核酸もしくは核酸分画を収集する；

ことを特徴とする方法。

2. 吸着液に使用される該塩が、過塩素酸ナトリウム、塩素酸グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、ヨウ化ナトリウムなどの1～8Mの濃度のカオトロピックの塩であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。

3. 該塩溶液のイオン強度を、1～10Mの塩化リチウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、酢酸ナトリウム、尿素などの試薬、および／またはそれらの混合物を用いて調節することを特徴とする請求の範囲第1項および／または第2項記載の方法。

4. 該無機基体材料の粒径が $0.1\mu\text{m}$ ～ $1,000\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかの項記載の方法。

5. 多孔性の無機基体材料が、使用する際に2～ $1,000\text{nm}$ の孔径を有することを特徴とする請求の範囲第1項乃至第4項のいずれかの項記載の方法。

6. 該多孔性もしくは非多孔性の基体材料、特にゼオライトが、荒充填物の形

で存在することを特徴とする請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかの項記載の方法。

7. 該多孔性もしくは非多孔性の基体材料、特にゼオライトが、ガラス、石英もしくはセラミックスの濾過層、および／またはシリカゲルを含有する薄膜の形で、および／または無機基体の粒子もしくは繊維、および石英もしくはガラスウールの織物として存在することを特徴とする請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかの項記載の方法。

8. 分離精製すべき該核酸が細胞培養物；何らかの組織；血液、血漿、血清、尿、糞便などの体液；バクテリア、特にヒト結核菌、サイトメガロウイルス、HIV、B型肝炎、C型肝炎、 δ 型肝炎のウイルス等のウイルスなどの微生物のような生物学的原料に由来し、該核酸がポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により得られる生成物；プラスミドDNA；ゲノムDNA、RNA；プラスミドDNA、染色体DNAもしくはRNAなどの微生物からの核酸；および／または配列分析からの核酸であることを特徴とする請求の範囲第1項乃至第7項のいずれかの項記載の方法。

9. 分別後、該核酸の10%以下が10kbより短いことを特徴とする請求の範囲第1項乃至第8項のいずれかの項記載の方法。

10. 該核酸がオリゴヌクレオチドであることを特徴とする請求の範囲第1項乃至第9項のいずれかの項記載の方法。

11. 試料の溶解後、シリカゲルへの吸着のための条件調節を単一工程で行うことを特徴とする請求の範囲第1項乃至第10項のいずれかの項記載の方法。

12. 試料のアルカリ性溶解後プラスミドの調製のために、シリカゲルへの吸着のための条件調節を単一工程で行うことを特徴とする請求の範囲第11項記載の方法。

13. プラスミド調製のためのプラスミドの吸着を洗剤の存在下で行うことを特徴とする請求の範囲第1項乃至第12項のいずれかの項記載の方法。

14. 修飾反応の後に続く核酸断片の精製分離のための、請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかの項記載の方法の使用。

15. 入口と出口を備えた中空体であって、該中空体の空洞内に分離すべき核

酸の吸着のための基体材料を固定する手段が配置されてなる中空体から構成される、請求の範囲第1項乃至第13項のいずれかの項記載の方法を実施するための装置において、

—該手段が2個のポリエチレンフリットからなり、1個は両者の間の空間だけ離れてもう1個より上に配置され、ここで基体材料は該ポリエチレンフリットの間に位置している、あるいは、

—該手段が、基体材料が埋め込まれた自己支持性の薄膜である、
ことを特徴とする装置。

16. 該中空体の空洞内への該手段の装着を、摩擦力および／または引張力により、および／または引張リングでの固定により行うことを特徴とする請求の範囲第15項記載の装置。

17. 高濃度の塩、および1～50容量%のC₁—C₃アルコール、および／またはPEG、および／または疎水性の無機および／または有機ポリマーを含有する水溶液。

18. 核酸を含有する混合物から核酸を無機基体に結合させるための緩衝液としての、請求の範囲第17項記載の溶液の使用。

19. 請求の範囲第17項記載の水溶液、および請求の範囲第15項および第16項のいずれかの項記載の装置を含有するキット。

【発明の詳細な説明】

クロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法

本発明の目的は、請求の範囲第1項前文記載のクロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法、修飾反応を施された核酸断片を精製するための該方法の使用、該方法を実施するための装置、本発明に係る方法において使用しうる水溶液および該水溶液の使用にある。

核酸をカオトロピックの塩の存在下でガラスやシリカゲルの粒子に吸着させることはよく知られている（ボーゲルシュタイン、B. およびギレスピー、D. (1979)；アガロースからのDNAの調製および分解的精製、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76: 615-619)。この方法によれば、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム、またはチオシアン酸グアニジン等の高濃度のカオトロピックの塩を用いると、DNAがアガロースゲルから単離、精製され、またRNA及びDNA調製物が種々の抽出物から単離、精製される（ブーム、R. 達 (1990)；核酸の迅速で簡易な精製法、J. Clin. Microbiol. 28, 495-503、及びヤマド、O. 他 (1990)；ポリメラーゼ連鎖反応のためのDNAまたはRNAの新規な抽出法、J. Virol. Methods 27, 203-210)。カオトロピック試薬の存在下で核酸の無機基体 (mineral substrate) への吸着を生じさせる物理的過程については詳しくはわかっていないが、この吸着の理由は水性媒体のより高次構造の妨害にあると信じられている。このことは、溶解した核酸のガラスまたはシリカゲルの粒子表面での吸着もしくは変性をもたらす。高濃度のカオトロピック塩の存在下では、この吸着はほぼ定量的に生じる。吸着した核酸の溶出は、低いイオン強度（塩濃度）の緩衝液の存在下で行われる。先行技術に係る方法は、核酸および断片の処理を100塩基対 (bp) ~ 50,000塩基対 (bp) の大きさの範囲で可能にする。しかしながら、現在に至るまで非常に短い（20~40のヌクレオチドの）一本鎖のオリゴヌクレオチド（たとえば、プライマー）から、短い一本鎖もしくは二本鎖の核酸断片（100bpかそれより小さい）を定量的に分離することは不可能であった。

一般に、このような核酸混合物はたとえばポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に

より、増幅生成物として生じる。多くの場合、この反応から得られた生成物は次いで、DNAの配列決定、DNAハイブリダイゼーション、クローニング、制限酵素分解および形質転換などの従来技術を用いて、分子生物学によって分析される。それにより、医学的診断（たとえば、HIV）の際に病原体の遺伝子診断や検出に関して、遺伝子変異についての情報のような分析的パラメータを得ることができる。それらの診断方法の潜在能力を最大に利用しうするためには、しばしば極小さい（100塩基対）これらのDNA断片の定量的な分離や精製が非常に重要である。

現在のところ有効な精製方法は、限外濾過、高圧液体クロマトグラフィー（HPLC）、もしくはカオトロピック塩の存在下で核酸断片のアガロースゲルからガラスやシリカゲル粒子上への沈殿による抽出に基づくものである。しかしながら、たとえば二本鎖のDNA断片（100-bp）とより小さな一本鎖のオリゴヌクレオチド（たとえば、39量体）とからなる核酸混合物の分離には、これらの方法は低い効率でしか役に立たない。

本発明の技術的な課題は、先行技術の上述したような欠点を回避しうる方法を提供することにある。この課題は請求の範囲第1項の概要に係る、クロマトグラフィーによる核酸混合物の精製分離法により解決される。それ以降の従属項第2項から第13項は、本発明に係る方法の好ましい態様に関する。

第14項は、修飾反応の後に続く核酸断片の精製のための本発明に係る方法の使用に関する。第15項は、本発明に係る方法を実施するための装置に関し、第16項は、本発明に係る装置の好ましい態様に関する。第17項は、本発明に係る方法において使用しうる水溶液に関し、そして第14項は、第15項と第17項の構成要素の組合せに関する。

本発明に係る方法は、カオトロピック塩、高イオン強度（高濃度）の塩溶液、たとえば尿素などの試薬またはそのような物質の混合物の存在下で、核酸が無機基体上に沈殿し、そして低イオン強度（塩濃度）の溶液の作用により溶出するというそれ自体は公知の特性を利用するものである。こうして、出願人によるPCT/E P 92/02775号は、低イオン強度の媒体に含まれる核酸混合物をま

ず陰イオン交換材料に吸着させた後、より高イオン強度の緩衝液によって核酸を脱着させ、次いでこのより高イオン強度の緩衝液に含まれる核酸を、より低級のアルコールおよび／またはポリエチレングリコールおよび／またはトリクロロ酢酸（TCA）などの有機酸の存在下で、無機基体材料に吸着させることを提案している。その後、好ましくは水または低イオン強度の緩衝液によって核酸を溶出させる。

今では、核酸の分離において陰イオン交換材料での予備的精製なしですませられることが判明している。驚くべきことに、高濃度のカオトロピック塩の存在下で核酸を吸着させ、低イオン強度の溶液によって核酸を脱着させることにより、核酸混合物の優れた分別を達成することもできる。

従って、本発明に係る方法は、分離すべき核酸を吸着、溶出させることにより予備的精製工程なしに一つの操作工程で、関心のある核酸分画を効率良く得ることを可能にする。

核酸を含む試料が精製、単離すべき核酸の原料として役立つならば、それらの原料をそれ自体公知のやり方で、例えば試薬による処理、あるいは超音波や砕解等の機械的作用によって消化する。核酸を受け入れるのに使用する溶液は既に高濃度のカオトロピック塩を含んでいてもよい。存在するかもしれないより大きな細胞成分を遠心分離または濾過により取り除いた後（WO 93/11218およびWO 93/11211）、高イオン強度のカオトロピック塩を有する溶液から核酸を無機基体に吸着させるために、溶液を無機基体材料に接触させる。

本発明に係る方法の変形は、吸着に用いられる緩衝システム内で直接核酸の消化を行うことにある。この場合には、特に好ましい核酸の分布を得ることができる。

核酸は通常、真核生物および／または原核生物の細胞（原生動物および真菌を含む）から、および／またはウイルスから得る。たとえば、細胞および／またはウイルスを高度の変性条件および、適切であるなら減数条件下で消化する（マニアティス、T.、フリッチュ、E. F.、ザムブルーク、S.、1982、分子クローニング実験手引、コールドスプリングハーバー大学出版、コールドスプリングハーバー）。

本発明のある特定の態様は、特に大腸菌からのプラスミドやコスミドDNAの単離に有用である。水酸化ナトリウム／SDSによる大腸菌細胞の溶解に続いて溶液を酢酸カリウム（KAc、0.2－0.9M）で中和する。普通はSDS溶解後、細胞溶解産物を3Mの酢酸カリウムによって中和する。次いで、細胞断片を遠心分離するために、5Mの塩素酸グアニジンまたは他のカオトロピック塩の高濃度溶液を細胞溶解産物に加える。大腸菌の小調製物では、これによりシリカゲルに吸着すべき試料が約2－3ml生ずる。しかしながら、その後数時間もかかる遠心分離にかけなければならないので、試料は好ましいものではない。

水酸化ナトリウム／SDSによる溶解後、本発明に係る方法では、たとえば好ましくは以下のものを含有する塩溶液を使用する。

0.2M KAc / 5.5M GuHCl、
 0.2M KAc / 5.5M GITC、
 0.2M NaAc / 6M NaClO₄、
 0.2M NaAc / 6M GuHCl、または
 0.2M NH₄Ac / 6M NaClO₄

これにより、細胞溶解産物の中和およびシリカゲル中での試料の高塩濃度状態への同時調節が達成され、日常業務では仕事の実質的な促進をもたらす。驚くべきことには更に、カオトロピック塩と組み合わせて、例えばSDS、NP40、ツイーン20、トリトンX-100、CTABなどの陰イオンや陽イオン系又は中性の洗剤の存在下で、核酸のシリカゲルへの吸着もまた生じること、あるいはこれらの洗剤の存在がDNAの収率までも増加させることが判明している。

変性試薬として洗剤による細胞の溶解および蛋白構造に特定の酵素や核酸開裂酵素による分解は、広く利用されている。こうして、例えば硫酸ドデシルナトリウム（SDS）およびEDTAは変性剤として使用され、プロテイナーゼKは蛋白を分解するのに用いられている。大抵の場合そのような溶解操作の結果は、フェノール抽出では核酸が単離されないような粘度の高いゼリー状の構造であり、核酸の長い部分はそのまま残っている。透析および沈殿の後、核酸は水性層から除去される。この溶解操作は組織片も溶解してしまうほど非核酸構造に対して攻撃的なものである。

しかしながら、反応容器の繰り返しの交換を含むこの重労働の技術のために、この方法は大量の試料の扱いと日常的な調製のためには好ましくない。この方法は自動化できるが、現在のところこの種の市販の装置は、4時間かけて一度に約8個の試料を処理することとなる(Applied Biosystems A 371)。従って、この方法は高価であり、多数の試料を通すのには適していない。別の欠点は、単離された核酸の長さのために酵素的増幅などのそれに続く反応に悪影響を及ぼすことである。さらに、得られた溶液は非常に粘度が高く扱いが難しい。特に、先行技術の方法により得られた核酸は更に処理するには別個の工程で開裂しなければならないので、非常に長さの長いDNAは相当手に余る。

アルカリ性媒体中で洗剤の存在下での真核生物および／または原核生物の細胞および／またはウイルスの消化は技術的には簡単なものであるが、上述したように好ましくない長さの長い核酸も生じる。

核酸の粗い調製の後には次の反応が続く。それらの続く反応は核酸のある程度の質を要求する。例えば、該核酸は概ね自然のままでなければならない、調製の収率は高くかつ再現可能でなければならない、そして更に核酸は高純度であって蛋白や細胞の代謝物を含んでいてはならない。調製の経路は簡便で経済的でかつ自動化が可能でなければならない。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(サイキ、R.、ゲルフアンド、D. H.、ストッフエル、S.、シャーフ、S. J.、ヒグチ、R.、ホルン、G. T.、ムーリス、K. B.、エーリッヒ、H. A. (1988)、Science 239、487-491) やリガーゼ連鎖反応(LCR)(EP-A-88311741. 8)のような酵素的増幅反応が利用される場合には特に、他の試料との相互混入の危険なしに核酸の調製が可能でなければならない。それらの続く反応には、あまり長鎖でない核酸が得られること、できることなら細胞が定量的に溶解されること、さらには先行技術で公知の消化方法の上記欠点が回避されることが望ましい。

これにより、真核細胞および／または原核細胞および／またはウイルスからもしくは体液から、核酸の単離及び濃縮を可能にする方法が望まれている。特に、こうして得られた核酸はあまり長鎖でないとの特徴を有し、少ない工程で単離でき、そして要求される次の反応に直接かけることができるべきである。

これを可能にする本発明に係る方法の前述の変形は、真核細胞および／または原核細胞および／またはウイルスのような核酸の原料を溶解することにある。

真核細胞および／または原核細胞および／またはウイルスなどの原料を含む核酸の該消化は、好ましくは物理的もしくは化学的作用によって実施することができる。機械的には超音波または浸透衝撃などによって、あるいは化学的には洗剤および／またはカオトロピック剤および／または有機溶媒（たとえば、フェノール、クロロホルム、エーテル）によって、またはアルカリ性消化により、溶解を成し遂げることができる。

この操作は、核酸の増幅のための酵素的方法と組み合わせると特に、高純度の核酸の調製をもたらす、そして定性的かつ定量的に再現可能な分解の実施を可能にする。洗剤および／またはカオトロピック剤、濃い塩溶液、尿などの試薬、これらの物質の混合物、および／または有機溶媒を使用する消化方法、あるいは試料の加熱などの物理的な消化方法が、それ以後の利用を容易にすることが証明されている。たとえば、本発明に係る方法を用いると、細胞および／またはウイルスおよび／または体液からより短い細胞DNA (< 50 kb) もしくは全核酸が得られる。精製方法（すなわち、核酸が結合し溶出する間の条件）は、結果として核酸の切断をもたらす。

吸着用緩衝液における高イオン強度のカオトロピック剤と、疎水性の有機または無機ポリマーおよび／またはアルコールおよび／またはトリクロロ酢酸（TCA）との組合せは、従来技術の精製方法とは対照的に、溶解後、核酸を石英繊維などの無機基体材料の表面に定量的かつ非常に特異的に固定し、従って溶解産物の混入成分を結合させないで更なるヌクレアーゼの攻撃から核酸を保護することを確実にする。核酸を固定したこの状態で、残存する混入成分を容易に洗い流し、続いてより少量の純粋な核酸を溶出させる。こうして、再現可能な平均鎖長20～40 kbが得られる。実施例7～9に記載したような消化条件下では、10%以下は10 kbよりも短い。これは、次の酵素的核酸増幅には最適な長さ分布であることを表している。

塩、特にカオトロピック剤とアルコールとの特別な組合せは、鎖長の広範囲なスペクトル（10～100,000塩基対）を有する核酸を同時に単離、精製す

ることを初めて可能にするものである。

高濃度の塩を含む吸着水溶液は、1～5個の炭素原子の鎖長を有する脂肪族アルコールまたはポリエチレングリコールを1～50容量%含有する。

好適な無機（鉱物）基体は、金属酸化物や混合金属酸化物に基づく多孔性または非多孔性の材料であり、シリカゲルでできたものや、基本的にガラス、アルミナ、ゼオライト、二酸化チタン、二酸化ジルコニウムからなる材料などである。ゼオライトは特に好適な無機基体であることが証明されている。

任意に、核酸が吸着した無機基体材料を、比較的高いアルコール含量のために核酸が脱着するのを防ぐような溶液で洗い流してもよい。

次いで、吸着した核酸を低塩濃度（イオン強度）の緩衝液で溶出させ、そして得られた核酸または核酸分画を集める。

好適なカオトロピック塩は、1～8Mの濃度の過塩素酸ナトリウム、塩素酸グアニジン（G u H C l）、イソチオシアン酸グアニジン（G T C）、ヨウ化カリウムである。＞1MのN a C l、K C l、L i C lなどの濃い塩溶液、尿素などの試薬（＞1M）、およびそのような成分の組合せも使用できる。カオトロピック塩の溶液中に存在するより低級のアルコールは、その範囲内で水に混和性である限りにおいて1～50%の量のメタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノールおよびペンタノールである。好ましく用いられるエチレングリコール類の分子量は1,000～100,000であり、特に6,000～8,000である。該ポリエチレングリコールは高イオン強度の緩衝液に1～30%の量で添加してもよい。

無機基体材料の粒径は、好ましくは0.1 μ m～1,000 μ mである。例えば多孔性シリカゲル、多孔性ガラス、多孔性アルミナ、ゼオライトなどの多孔性無機基体を使用するならば、孔径は好ましくは2～1,000nmである。基体材料をたとえば荒い充填物の形で存在させて、分離精製すべき核酸を含む溶液と接触させることができる。

しかしながら、好ましいのは入口と出口を備えた中空体内に配置された濾過層の形状の多孔性および非多孔性の基体材料である。濾過層はガラス、石英、セラミックスまたは鉱物などの他の材料でできた立体（織物）もしくは非立体の繊維

から構成されたり、あるいはシリカゲルの含有した薄膜から構成される。

本発明に係る方法は、特にごく僅かに異なる鎖長を有する短鎖の核酸を含む、核酸混合物の分離に極めて有益である。従って、たとえば100bpの大きさのDNA断片をより小さな一本鎖のオリゴヌクレオチド、たとえば39量体から分離することができる。この場合に、限外濾過、HPLC、またはカオトロピック塩だけの使用などの他の従来の精製法に比べて、DNAの収率はそれから60～70%も増加する。

核酸を含む原料の消化を受容（吸着）緩衝液中で行う本発明に係る方法を用いると、一定の核酸の長さスペクトルを有する核酸の調製が可能である。

本発明に係る方法は、どのような由来の核酸混合物であろうと処理することができる。従って、全種類の組織、血液や糞便物のような体液などの生物学的原料から、どんな速度であろうと高濃度の塩、好ましくは高濃度のカオトロピックイオンを含む溶液中への試料の導入からなる試料の適当な下準備後に、核酸を得ることができる。化学反応により生じた核酸、たとえばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により得られたもの、またはプラスミドDNA、ゲノムDNAおよびRNA、および／または微生物に由来した核酸も本発明に従って分離精製することができる。

本発明に係る方法には、次のクローニングや配列決定のための大腸菌からのいわゆるプラスミドDNAの小調製物の使用も含まれる；本発明に係る方法は、全血、血漿、血清、組織、細胞培養物、バクテリア、特にヒト結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、ウイルス、たとえばサイトメガロウイルス（核酸DNA）、RNAウイルス、たとえばHIV、B型肝炎、C型肝炎、δ型肝炎のウイルスからDNAおよび／またはRNAを単離するのにも有効である。オリゴヌクレオチドも本発明に係る方法の目的に含まれる核酸である。さらに、核酸は配列決定反応または他の同じような反応から誘導されたものであってもよい。全血からのDNAまたはRNAの調製は特に次のHLA型の決定に有用である。本発明に係る方法は特に、ヒト結核菌から核酸を単離するのに有用である。このことは、従来の単離技術では不満足な結果しか生じなかったのに対し、かなり抜本的な消化方法の必要性を含んでいる。

本発明に係る方法において好ましく用いられる装置は、入口と出口を備えた、特に円筒状の中空体である。中空体を通過する溶液の流れの方向に見て出口の近くに、核酸が吸着することになる無機基体材料がおかれる。好ましい態様では2個のポリエチレンフリットから構成され、1個が両者の間の空間だけ離れてもう1個より上に配置された手段により基体材料が固定され、基体材料は中空体の空洞内のポリエチレンフリットの間の該空間に位置する。基体材料を固定するための手段はまた、基体材料が埋め込まれた自己支持性の薄膜であってもよい。基体材料または基体材料を固定する手段の装着は、たとえば該手段を中空体内に留めることにより、および／または該手段を引張リングで固定することにより発生する摩擦力または引張力によって成し遂げることができる。

該手段、好ましくはポリエチレンまたはポリプロピレンのフリットの孔径は、溶解産物の成分が妨害されることなく通過できるぐらい十分に大きくなければならない。好ましくは、該手段の孔径は5～200 μm である。この装置は、非常に高い蛋白含量の高粘度溶解産物（たとえば、非常に高含量のヘモグロビンを含む血液溶解産物）からでも、核酸の簡易、迅速かつ再現可能な単離を初めて可能するものである。

特に好ましい態様では、無機基体材料は遊離した核酸を吸着させる、孔径が<5 μm のシリカゲル、ガラスまたは石英の繊維でできた網状の薄膜である。

別の好ましい態様は、無機基体材料が1～50 μm の粒径のシリカゲルまたは石英ゲルなどの特定の無機ポリマーである装置により表される。

該中空体はたとえば市販の管であってもよい。きつく押し込められた2個の手段、たとえば50～200 μm の孔径のポリエチレンフリットの間に、シリカ、ガラスまたは石英の繊維もしくはシリカゲルでできた薄膜であって、0.1～1 μm の範囲の大きさの孔を有する1層もしくは数層の薄膜がある。この薄膜の厚さは約0.2～1.0mm、特には0.6mmである。

薄膜材料の容量は、DNA約20～100 μg である。もちろん、そのような薄膜を相互に積み重ねることによりDNAの容量を増やすことができる。ごく小さな機械的歪だけがあると、薄膜端部の装置への溶接や粘着も考慮に入れてもよく、その場合には薄膜が該手段なしで中空体を密封するほどなので、該手段の安

定化効果なしですませることができる。それから薄膜は、引張リングを置くことにより中空体内に固定されてもよい。

小さなカラムに、上述したように孔径 $35\ \mu\text{m}$ の2個のポリエチレンフリットの間に位置するようにシリカゲルを充填することもできる。好ましくは、上部のフリットはより大きな孔 ($10-250\ \mu\text{m}$ 、特に $50\ \mu\text{m}$) を有するようによばれる。該カラムには好ましくは、 3mm の充填レベルに対応して約 70mg のシリカゲルが充填される。

微小滴定用プレートフォーマットで各々8個の同時調製装置（ほぼ同時調製で96個の装置）を有するストリップでの、および／または濾過工程および／または脱塩工程との組合せでの、上記方法の使用もまた好ましいものである（本出願人による特許出願P4127276. 5号、P4139664. 2号参照）。

装置の好ましい態様では、厚さ $0.5-1.5\text{mm}$ で孔径約 $10\ \mu\text{m}$ のポリエチレンフリットが、基本的に円筒状の中空体の形状の遠心クロマトグラフィー用カラム内に固定される。このフリットの上に、粒径約 $10-15\ \mu\text{m}$ で孔径 $40-120$ オングストロームのシリカゲルの層が約2倍の厚さで充填され、この層は第一のフリットと同一種であってもよい第二のフリットで密封される。好ましくは、シリカゲル層はフリット間の圧力によって圧縮されてもよい。

クロマトグラフィー用カラムの別の態様は、孔径約 $50\ \mu\text{m}$ の2個のポリエチレンフリットの間に位置する基体材料として、長さ $10-300\ \mu\text{m}$ のガラス繊維片からなる。他の好適な基体材料は、ガラス繊維紙、石英繊維紙、ガラス繊維織物、および他の無機質の紙および織物である。

装置の別の好ましい態様は、シリカゲル粒子が埋め込まれた出口付近の薄膜からなる。この場合に、好ましくは自己支持性である薄膜は特に引張リングによって固定されてもよい。シリカゲル薄膜として、3M社のエンポール (Empore) シリカゲル薄膜が有利に使用することができる。シリカゲルと多孔性PVCとからなるシリカゲル薄膜も円筒状中空体の空洞内に、特に引張リングによって固定されてもよい。

本発明に係る方法の好ましい態様では、たとえばその態様の1つの上記装置に分離すべき核酸混合物の溶液を注ぐ。次いで、吸引または遠心分離または同等の

処置並びにそれらの組合せにより、溶液を無機基体に通す。次に、溶液が高イオン強度（塩濃度）である限り長い間、核酸を基体材料に吸着させる。

本発明を、以下の実施例によってさらに詳細に説明する。

実施例 1

高転写プラスミドDNAの単離

HB101培養物3mlからのpUC18プラスミドを含む大腸菌細胞を遠心分離し、緩衝液P1（10mMのTris-HCl、pH8、100 μ g/mlのRNaseA）0.25ml中に再び懸濁し、そして緩衝液P2（0.2MのNaOH、2%のSDS）0.25mlを加えることにより溶解する。緩衝液N3（4.2Mの塩素酸グアニジン、0.9Mの酢酸カリウム、pH4.8）0.35mlを加えて試料を中和し、同時に最終濃度である1.75MのGuHClに調節する。この濃度はそれ以上の工程を必要としないで結合を確実にする。細胞断片及び沈殿したSDSを取り除くために、溶解した試料を13,000rpmのエッペンドルフ小遠心機で10分間遠心分離する。プラスミドDNAを含む上澄みを直ちに遠心クロマトグラフィー用カラムにピペットで注ぐ。この遠心クロマトグラフィー用カラムを2mlの遠心管内で遠心分離にかけ、そして不純物および蛋白を取り除くために、PB緩衝液（5Mの塩素酸グアニジン、30%のイソプロパノール）0.5mlでの新しい遠心分離によって洗う。遠心クロマトグラフィー用カラムを、80%のエタノール／水によって遠心分離することにより洗って一旦塩を含まないようにし、次いで余分なエタノールを完全に除去するために30～60秒間遠心分離する。溶出には、溶出用緩衝液（10mMのtris-HCl、pH8.5）0.05～0.2mlを、1.5mlの遠心管内で遠心クロマトグラフィー用カラムに通して遠心分離する。プラスミドDNAはその時、非常に低濃度の塩の溶液中に濃縮した形で存在する。収量は、A260/A280の比率が1.75のプラスミドDNA15 μ g～20 μ gである。

実施例 2

培養物5mlからの高転写プラスミドDNAの単離

実施例1に従って、pUC18プラスミド/XL1Blue培養物5mlの細

胞溶解産物を調製し、シリカゲル充填物を含む遠心クロマトグラフィー用カラムによって遠心分離し、そして洗浄する。プラスミドDNAを、80℃に熱したTE緩衝液（10mMのtris/HCl、pH8.5、1mMのEDTA）0.1mlで溶出する。収量は、A260/A280の比率が1.7のプラスミドDNA15-20 μ gである。

実施例3

低転写プラスミドDNAの単離

実施例1に従って、pBR322プラスミド/XL1Blue培養物5mlの細胞溶解産物を調製し、ガラスまたは石英の繊維薄膜を含む遠心クロマトグラフィー用カラムによって遠心分離し、そして洗浄する。プラスミドDNAを、80℃に熱したTE緩衝液（10mMのtris/HCl、pH8.5、1mMのEDTA）0.1mlで溶出する。収量は、A260/A280の比率が1.7のプラスミドDNA5-10 μ gである。

実施例4

増幅生成物の精製

PCR増幅反応物100 μ lを、PB緩衝液（5MのGuHCl、30%のイソプロパノール）500 μ lに混合する；反応混合物を覆うパラフィン油層の予備分離は不要である。この混合物を、シリカゲル薄膜を含む遠心クロマトグラフィー用カラムにピペットで注ぎ、1.5mlの遠心管内で遠心分離にかける。遠心クロマトグラフィー用カラムを、80%のEtOH/水での処理により洗って殆ど塩を含まないようにする。溶出には、溶出用緩衝液（10mMのtris、pH8.5）50 μ lを、別の遠心管内で遠心クロマトグラフィー用カラムに通して遠心分離する。こうして精製されたPCR生成物にはプライマー、dNTPs、ポリメラーゼおよび塩が含まれず、たとえば『周期配列決定』プロトコルを利用するABI配列決定器の配列決定反応に直接用いることができる。

実施例5

制限反応後のDNAの精製

DNA1 μ gを制限エンドヌクレアーゼで処理する。このDNA制限反応物を

実施例4に従ってPB緩衝液500 μ lに混合し、そしてそれ以後の処理は実施例4におけるのと同様である。溶出後得られたDNAには制限エンドヌクレアーゼおよび塩が含まれず、260/280の比率は1.8である。

実施例6

酵素的放射性標識後のDNAの精製

DNA 1 μ gを、 γ - 32 P-ATPの存在下でオリゴ標識操作によって放射性標識する。反応混合物を実施例4におけるのと同様に処理する。それにより、標識されたDNAを未取り込みdNTPs、 γ - 32 P-ATP、塩およびクレノフポリメラーゼから精製し、そして直接ハイブリダイゼーション反応に用いることができる。

実施例7

血液からの核酸の調製

血液からの全核酸の調製：1.5mlのPPN管中のクエン酸塩、ヘパリンまたはFDTAの血液200 μ lに、カオトロピック塩（塩素酸グアニジン（GuHCl）、イソチオシアン酸グアニジン（GTC）、ヨウ化カリウム）の4-8M溶液200 μ lを加え、任意に有機溶媒（フェノール、クロロホルム、エーテル）、および5-100%の洗剤（NP40、ツイーン20、トリトンX-100、SDS、CTAB）を添加する。次いで、プロテアーゼ200-1000 μ gを加え、混合物を70℃で10分間あるいはもっと低温で長時間（例えば、室温で30分間）かけて培養する。この工程で、真核細胞および／または原核細胞および／またはウイルス全部の効率良い溶解（付随的に感染力のある病原体の不活性化を伴う）、および蛋白の変性と酵素的分解（付随的に核酸に結合した蛋白の除去を伴う）が同時に起こる。95-100%のアルコール（メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、PEG、第二級および第三級、短鎖または長鎖のアルコール）210 μ lを添加すると、核酸に非常に特異的な結合条件を与え、そしてこうして調節された溶解産物を装置に移す。次に、

溶解産物を遠心分離または圧力をかけることにより薄膜またはゲルマトリックスに通して、核酸を薄膜繊維またはゲル粒子に可逆的に結合させる。蛋白、ヘム、

ヘパリン、鉄イオン、代謝物などの不純物を、100mMのNaCl、10mMのtris/HCl pH7.5、30-80%の純アルコール（メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、PEG、第二級および第三級、短鎖または長鎖のアルコール）またはアルコール混合物0.7mlで洗い流す。DNAを、低濃度の塩を含む緩衝液（10mMのtris/HCl、pH9.0）かあるいは蒸留水（脱イオン水）で溶出する。このような溶出操作の利点は、こうして得られたDNAを更に沈殿や緩衝液交換の工程なしに直接、次の反応、特にPCRに使用することができることである。他の体液、たとえば精液、たん、尿、糞便、汗、唾液、鼻の粘液、血清、血漿、脳脊髄液などからの核酸の調製もまた可能である。

核酸の単離のためのこの簡易な方法は、自動化、特に出願DE-A4127276.5、WO93/11218、WO93/11211およびDE-A4139664.2の事項と組み合わせた自動化の可能性が大いにある。

実施例8

極少量または痕跡量の血液からの全核酸の調製

1. 5mlのPPN管中の、クエン酸塩、ヘパリンまたはFDTAの血液、もしくは凍結および再解凍血液、もしくは繊維組織中の乾燥痕跡量からの再生血液1-50 μ lに、カオトロピック塩（塩素酸グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、ヨウ化カリウム）の4-8M溶液1-50 μ lを加え、任意に有機溶媒（フェノール、クロロホルム、エーテル）、および1-100%の洗剤（NP40、ツイーン20、トリトンX-100、SDS、CTAB）を添加する。次いで、プロテアーゼ1-200 μ gを加え、混合物を70℃で1分間あるいはもっと低温で長時間（たとえば、室温で10分間）かけて培養する。

この工程で、真核細胞および／または原核細胞および／またはウイルス全部の効率良い溶解（付随的に感染力のある病原体の不活性化を伴う）、及び蛋白の変性と酵素的分解（付随的に核酸に結合した蛋白の除去を伴う）が同時に起こる。

95-100%のアルコール（メタノール、エタノール、n-プロパノール、イ

ソプロパノール、第二級および第三級、短鎖または長鎖のアルコール）もしくは

有機ポリマー（PEG）を1/2容量添加すると、核酸に非常に特異的結合条件を与え、そしてこうして調節された溶解産物を装置に移す。次に、溶解産物を遠心分離または圧力をかけることにより薄膜またはゲルマトリックスに通して、核酸を薄膜繊維またはゲル粒子に可逆的に結合させる。蛋白、ヘム、ヘパリン、鉄イオン、代謝物などの不純物を、100mMのNaCl、10mMのtris/HCl、pH7.5、30-80%の純アルコール（メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、PEG、第二級及び第三級、短鎖または長鎖のアルコール）またはアルコール混合物0.7mlで洗い流す。DNAを、低濃度の塩を含む緩衝液（10mMのtris/HCl、pH9.0）かあるいは蒸留水（脱イオン水）で溶出する。このような溶出操作の利点は、こうして得られたDNAを更に沈殿や緩衝液交換の工程なしに直接、次の反応、特にPCRに使用できることである。

この方法は、極少量又は乾燥痕跡量の他の体液（精液、たん、尿、糞便、汗、唾液、鼻の粘液、血清、血漿、脳脊髄液など）からの核酸の調製にもまた有益である。

核酸の単離のためのこの簡易な方法は、自動化、特に出願DE-A4127276.5、WO93/11218、WO93/11211およびDE-A4139664.2の事項と組み合わせた自動化の可能性が大いにある。

実施例9

組織からの全核酸の調製

PPN管中の組織100 μ g~10mgに、カオトロピック塩（塩素酸グアニジン、イソチオシアン酸グアニジン、ヨウ化カリウム）の4-8M溶液を加え、任意に有機溶媒（フェノール、クロロホルム、エーテル）、および5-100%の洗剤（NP40、ツイーン20、トリトンX-100、SDS、CTAB）を添加し、そして全体を液体窒素中で市販のホモゲナイザーによってまたは乳鉢でたたいて粉末にすることにより均質化する。次いで、プロテアーゼ100-1000 μ gを加え、混合物を70℃で10-20分間あるいはもっと低温で長時間（たとえば、室温で30-60分間）かけて培養する。この工程で、真核細胞

および／または原核細胞および／またはウイルス全部の効率良い溶解（付随的に感染力のある病原体の不活性化を伴う）、および蛋白の変性と酵素的分解（付随的に核酸に結合した蛋白の除去を伴う）が同時に起こる。95-100%のアルコール（メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、PEG、第二級及び第三級、短鎖又は長鎖のアルコール）を1/2容量添加すると、核酸に非常に特異的結合条件を与え、そしてこうして調節された溶解産物を装置に移す。次に、溶解産物を遠心分離または圧力をかけることにより薄膜またはゲルマトリックスに通して、核酸を薄膜繊維又はゲル粒子に可逆的に結合させる。蛋白、ヘム、ヘパリン、鉄イオン、代謝物などの不純物を、100mMのNaCl、10mMのtris/HCl、pH7.5、30-80%の純アルコール（メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール、PEG、第二級および第三級、短鎖または長鎖のアルコール）またはアルコール混合物0.7mlで洗い流す。DNAを、低濃度の塩を含む緩衝液（10mMのtris/HCl、pH9.0）かあるいは蒸留水（脱イオン水）で溶出する。このような溶出操作の利点は、こうして得られたDNAを更に沈殿や緩衝液交換の工程なしに直接、次の反応、特にPCRに使用できることである。

核酸の単離のためのこの簡易な方法は、特に腫瘍を含む全ての組織から再現可能に機能し、そして自動化、特に同一出願人による出願DE-A4127276.5、WO93/11218、WO93/11211およびDE-A4139664.2の事項と組み合わせた自動化の可能性が大いにある。

実施例10

アガロースゲルからのDNA断片の精製

DNA断片をアガロースゲル（TAEまたはTBE 0.5-2%）中で分離する。単離すべきDNA断片をゲルから切り出して、1.5mlのエッペンドルフ容器中でQX1緩衝液（7MのNaPO₄、10mMのNaAc、pH5.3）300μlと混合する。50℃で10分間の培養後には、アガロースは溶解している。この溶液を実施例1に従って遠心クロマトグラフィー用カラムに入れて遠心分離にかける。次いで、80%のエタノール／水をカラムに通して遠心分離することにより、遠心クロマトグラフィー用カラムを洗って塩を含まないように

し、その後余分なエタノールを完全に除去するために1分間遠心分離する。溶出には、遠心クロマトグラフィー用カラムに溶出用緩衝液(10 mMのtris/HCl、pH 8.5) 0.05 mlを入れて遠心分離する。

実施例 1 1

ポリアクリルアミド(PAA)ゲルからのDNA断片の精製

単離すべきDNA断片を、PAAゲルから切り出して2 mlのエッペンドルフ容器に移し、ゲルを圧潰して、PAA溶出用緩衝液(500 mMのNH₄Ac、100 mMのMgAc₂、1 mMのEDTA、0.1%のSDS) 500 μ lと混合する。混合物を50℃で30分間培養し、次いでQX1緩衝液300 μ lを添加した後、遠心クロマトグラフィー用カラムによって遠心分離にかける。次に、遠心クロマトグラフィー用カラムを80%のエタノール/水で洗って塩を含まないようにし、その後余分なエタノールを完全に除去するために1分間遠心分離する。溶出には、遠心クロマトグラフィー用カラムに溶出用緩衝液(10 mMのtris/HCl、pH 8.5) 0.1 mlを入れて遠心分離する。

実施例 1 2

大きな(>3,000 bp)PCR断片の精製

PCR増幅反応物100 μ lをQXB緩衝液(5 MのGuHCl) 500 μ lに混合する；反応混合物を覆うパラフィン油層の予備分離は不要である。それ以後の精製は実施例4におけるのと同様に行う。

実施例 1 3

一本鎖PCR生成物の精製

不整PCRの増幅混合物100 μ lを、PB緩衝液(5 MのGuHCl、30%のイソプロパノール) 500 μ lに混合する。それ以後の精製は実施例4におけるのと同様に行う。溶出には、遠心クロマトグラフィー用カラムに溶出用緩衝液(10 mMのtris/HCl、pH 8.5) 0.05 mlを入れて遠心分離にかける。溶出液は、第二増幅もしくは配列決定に直接使用できる一本鎖PCR生成物を約90%含有することになる。

実施例 1 4

組織または細胞からの全核酸の調製

組織50mgまでもしくは細胞 10^6 個までを、緩衝化したカオトロピック液(4MのGTC、25mMのクエン酸ナトリウム、pH7.5、2%の2-メルカプトエタノール)400 μ l中で均質化し、任意に5-100%の洗剤(NP40、ツイーン20、トリトン-X-100、SDS、CTAB、ザルコジル)と混合する。この工程で、真核細胞および／または原核細胞および／またはウイルス全部の効率良い溶解(付随的に感染力のある病原体の不活性化を伴う)、および蛋白の変性(特にリボヌクレアーゼ;付随的に核酸に結合した蛋白の除去を伴う)が同時に起こる。100%のアルコール(メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール)260 μ lを添加すると、核酸に非常に特異的結合条件を与える。こうして調節された溶解産物を装置に移す。

次いで、蛋白、ヘム、ヘパリン、代謝物等の不純物を、1MのGTC、25mMのtris/HCl、pH7.5、40%のアルコール(メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール)からなる洗浄用緩衝液700 μ lで洗い流し、そして10mMのtris/HCl、pH7.5、80%のアルコール(メタノール、エタノール、n-プロパノール、イソプロパノール)からなる洗浄用緩衝液700 μ lで洗い流す。核酸を、低濃度の塩を含む緩衝液(10mMのtris、pH7.5)かあるいは蒸留水(脱イオン水)で溶出する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H1/08 C12N15/10 C07H21/00 | | Internat. Application No. PCT/EP 94/02056 |
|--|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H C12N B01D | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO, A, 93 11221 (DIAGEN INSTITUT FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE DIAGNOSTIK GMBH) 10 June 1993 cited in the application see claims; examples --- | 1-19 |
| X | EP, A, 0 389 063 (AKZO N.V.) 26 September 1990 see claims; examples ----- | 1-16 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 8 November 1994 | | Date of mailing of the international search report 16. 11. 94 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2230 11V Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Day, G |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/EP 94/02056

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9311221 | 10-06-93 | DE-A- 4139664 | 03-06-93 |
| | | WO-A- 9311218 | 10-06-93 |
| | | EP-A- 0616638 | 28-09-94 |
| | | EP-A- 0616639 | 28-09-94 |
| EP-A-0389063 | 26-09-90 | NL-A- 8900725 | 16-10-90 |
| | | AU-B- 641641 | 30-09-93 |
| | | AU-A- 5215390 | 27-09-90 |
| | | CA-A- 2012777 | 23-09-90 |
| | | JP-A- 2289596 | 29-11-90 |
| | | US-A- 5234809 | 10-08-93 |

 フロントページの続き

| (51)Int.Cl. ⁸ | 識別記号 | 序内整理番号 | F I |
|--------------------------|------|---------|-----|
| C 1 2 N 15/09 | | | |
| C 1 2 Q 1/68 | Z | 9453-4B | |
| G 0 1 N 30/02 | J | 7363-2J | |
| 30/26 | A | 7363-2J | |
| 30/48 | E | 7363-2J | |
| | K | 7363-2J | |
| | H | 7363-2J | |
| | A | 7363-2J | |
| 30/88 | E | 7363-2J | |
| (72)発明者 ヘルマン、ラルフ | | | |
| ドイツ連邦共和国、ケルン、デー—50674、 | | | |
| マイスター—ゲールハルト—シュトラ—セ | | | |
| 2 | | | |
| (72)発明者 ホイサー、ベートラ | | | |
| ドイツ連邦共和国、ケルン、デー—50933、 | | | |
| ベルフェデレーシュトラ—セ 46 | | | |
| (72)発明者 バスティアー—ン、ヘルガ | | | |
| ドイツ連邦共和国、メッテマン、デー— | | | |
| 40822、アム・ヴェーバーズビューシュケ | | | |
| ン 22 | | | |